

# 分子生物技術應用在防檢疫害蟲之速鑑定

石正人 邱一中

國立臺灣大學 昆蟲學系  
台北市羅斯福路四段一號

## 摘要

隨著國際間農產品自由交易的大量增加，病蟲害入侵和擴散問題迫在眉睫，如何做好害蟲的檢疫工作，防止外來害蟲入侵是非常重要的。農產品進口若有疑似的檢疫害蟲存在時，常須將害蟲飼養到成蟲方能從事鑑定，不但費時，且害蟲常常在飼養中途便即死亡，徒增國際貿易糾紛與困擾，因此開發快速準確的害蟲檢疫方法非常重要。目前較常使用的方法有下列數種：1. 同功異構酵素型態 (isozyme patterns) 的分析：如利用膠體電泳得到 esterase isozyme patterns 可用來區分不同的 biotypes；2. DNA 指紋 (DNA fingerprinting) 技術：利用 Southern blot analysis 配合特製的 DNA probes 做雜合反應，利用雜合結果鑑定出不同的昆蟲；3. 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 和限制酵素片段多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析：最常利用 ribosomal DNA 中的 18S 和 internal transcribed spacer (ITS) 或 mitochondrial DNA 的差異分析，而辨識不同種的昆蟲；4. PCR 指紋 (PCR fingerprinting) 分析：此法是目前最常應用於鑑定分析的技術，如大家耳熟能詳的 DNA 隨機增幅多態型 (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 和 DNA 增幅指紋 (DNA amplification fingerprinting, DAF) 均屬於此類技術，利用 random primer 或 arbitrary primer 的方式，配合 PCR 的技術來分析 DNA 組成序列的差異，進而鑑別不同種的昆蟲。這些方法均可針對檢疫害蟲的卵、幼蟲、蛹或成蟲提供快速、準確且操作容易的鑑定，因此很適合用於檢疫害蟲快速鑑定，建立害蟲的標準資料庫，進而提供海關人員及國內防疫人員進行害蟲的鑑定。

## 壹、前言

台灣地處亞熱帶，終年適合昆蟲生長繁衍，因此蟲害問題一直威脅農民並困擾農政單位。海島國家四面環海，是賴以阻隔外來害蟲入侵的天然

屏障，然而由於國際自由貿易與人員交流日益頻繁，而漸失其屏障功能。一旦外來害蟲入侵，在台灣豐富的天然資源與適合昆蟲生長的氣候條件下，其擴散與危害問題，勢必一發而不可收拾，造成農作物的蟲害問題並引起生態環境的衝擊，因此如何作好害蟲檢疫工作，防止外來害蟲入侵是當前重要的課題。

害蟲檢疫防疫制度是害蟲綜合管理系統中重要且不可或缺的一環，建立完善的害蟲檢疫防疫制度，除了能阻絕外來害蟲入侵外，也可遏止外國農產品的傾銷，是公認且合法的農業保護措施。害蟲檢疫的首要工作是害蟲種類的鑑定，然而，昆蟲種類繁多，外部形態特徵差異細微，實非位於港口、機場的檢疫人員所能勝任，而駕輕就熟的進行鑑定工作。此外，昆蟲分類一般習以成蟲的外部形態作為鑑定依據，而在未成熟時期（卵、幼蟲或蛹）的分類，由於形態的不穩定或特徵不明顯而難以鑑定分類。但在農產品交易發現有害蟲存在時，往往隱藏其中的害蟲多處於未成熟時期，因此更增加害蟲檢疫鑑定的困難度。

進出口的蔬菜、水果或花卉等農產品，必須維持其新鮮度，因此在害蟲檢疫防疫上有一定的時效性要求。目前對發現未成熟時期的害蟲，常需飼養至成蟲方能從事鑑定，如此不但耗時難被接受，且發現的害蟲數量通常不多，能順利飼養至成蟲的比率甚低，徒增國際貿易糾紛與困擾。因此開發快速、簡易且準確的檢疫害蟲鑑定技術，廣泛適用於各種不同發育時期的昆蟲，且只需要少數疑似的樣品便可以完成鑑定工作，是目前落實害蟲檢疫最基本的要求。

目前昆蟲分類方法除了利用傳統的外部形態特徵鑑定外，已逐漸進入分子的層次，隨著生物技術的快速發展，提供許多新的技術和分析標誌，利用各種分子標誌 (molecular markers) 作為分類依據進行種類的鑑定工作。這些分析標誌包括蛋白質和核酸，透過這些新的技術和分析標誌，可以有效的探討形態標誌無法解決的部份問題，特別是外型相似的種類或不同地理分佈的族群鑑定。本文將分別介紹同功異構酵素型態 (isozyme patterns) 分析、DNA 指紋 (DNA fingerprinting)、聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 和限制酵素片段長度多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析以及 PCR 指紋 (PCR fingerprinting) 等生物技術在快速鑑定上的應用。

## 貳、快速鑑定常用的生物技術

### 一、同功異構酵素型態 (isozyme patterns) 的分析

同功異構酵素是指一群催化相同受質進行同一化學反應的酵素，但在分子結構上或物理特性上會因生物種類的不同而具有差異性，此種差異一般可利用膠體電泳技術，以外加的電場加以分離區分。由於被分析的蛋白質酵素各成份因分子大小及所帶的電性、價位不同，因此在膠片上的移動速度不一而形成差異，再利用活性染色技術使電泳膠片上分離區分的酵素條帶呈色，直接觀察比對電泳膠片上條帶，以此推斷酵素基因的差異情形，如此可作為種類的鑑定或分類的依據 (Hillis *et al.*, 1996)。

在一定的條件下，測量同功異構酵素在電泳膠片上泳動的距離以及個數，再和已知的對照組比較，便可以確立細胞株的種源或鑑定出種類。Inoue and Mitsuhashi (1988) 將建立的 SES-BoMo-15A 細胞株與其他四種鱗翅目細胞株做同功異構酵素電泳分析，分別針對 isocitrate dehydrogenase、phosphoglucose isomerase、malic enzyme 及 phosphoglucomutase 四種同功異構酵素做活性染色。在同一種同功異構酵素之中，不同的細胞株所形成的圖譜均不相同，而得到不錯的鑑別效果。Bassi and Veuille (1995) 利用 alcohol dehydrogenase (ADH) 同功異構酵素來分析鑑別採集自歐洲、西非及東非等不同地點的黃果蠅 (*Drosophila melanogaster*) 族群之差異。Dadour *et al.* (1992) 提出利用蛋白質電泳的方式來從事物種的快速鑑定，其中選用 phosphoglucomutase、phosphoglucose isomerase、malate dehydrogenase、malic enzyme、isocitrate dehydrogenase 及 alcohol dehydrogenase 等六種同功異構酵素，針對地中海果實蠅 (Mediterranean fruit fly) 中的幼蟲和蛹的生長時期來區分出其中的 *Bactrocera tryoni* 種類。

Zenhder *et al.* (1983) 提出以電泳及電顯等方法，用以區別三種斑潛蠅，他們使用了四種同功異構酵素作為鑑別的分分子標誌，也得到不錯的鑑定效果。Liu *et al.* (1992) 採集 California 的 *Bemisia tabaci* 發現是一群混合的 biotypes，而這些 biotypes 不易利用形態學的方法加以區分，但是利用同功異構酵素中之 esterase 做電泳形態分析，便可以清楚的區分出來，而且同一種 biotype 在不同發育時期，或取食不同的作物，都具有相同的圖譜，顯示出在種內的穩定性以及種間的差異性，足可作為鑑定的依據。Gunning *et al.* (1997) 也利用 esterase isoenzyme 的電泳分析方式，清楚的鑑定出採集於澳大利亞各地的 Non-B 和 B-Biotype 的 *Bemisia tabaci*。在海關檢疫要求快速判別種類的場合之下，此種方法不失為具有開發潛力的快速

鑑定方法。

同功異構酵素型態分析技術的優點為：

1. 在分子層次的研究中，此技術是具低成本且高效率的方法。
2. 同功異構酵素是廣泛分布於生物體中的蛋白質，在各器官或不同的發育期中均可找到，且分析時僅需要少量的樣品即可。
3. 可在短時間內同時檢測分析大量的樣品。
4. 不同種類的遺傳差異可以直接在電泳膠片上檢測分析比較。

此種分析技術不足之處在於：

1. 分析時的材料必須是新鮮的或是經低溫冷凍處理保存的材料。
2. 在實驗處理過程中，同功異構酵素可能會改變或變性，影響實驗的結果。
3. 低估了大量的差異 (核酸序列不同，但轉譯合成相同的胺基酸序列)，據估計此方法大約只能檢測出 30% 的差異程度。

## 二、DNA 指紋 (DNA fingerprinting) 技術

此技術首先需將樣品的染色體 DNA 抽取純化，並以特定的核酸限制內切酵素做切割處理，再經由膠體電泳加以區分，其次利用 Southern blot 得方法將這些分離的 DNA 片段轉印到 nylon membrane 上，最後再以特製的重複性序列並帶有放射性  $P^{32}$  或螢光酵素標記之探針 (probe)，與轉印的 DNA 片段進行雜合反應分析。探針雜合的位置很多而形成多樣性的條紋圖譜，此即所謂的 DNA 指紋，利用此指紋圖譜上的差異而作為鑑定區別的依據，此技術的專一性極高 (徐及曾, 1993)。

DNA 指紋技術的應用很廣，它最早是被運用於人類個體的確認、親緣關係的鑑定，尤其是應用在刑事精液、血液和毛髮的個體專一性鑑識，親子關係的確定上。其後應用作為物種鑑定時的標誌 (marker)，並廣泛運用在動植物遺傳圖譜 (genetic map) 的構築，以及性狀遺傳標誌的確立，如用來建立人類染色體圖譜、構築經濟作物或微生物病原的基因圖譜等。其次此技術也可利用基因的連鎖關係，而將一些基因的性狀在 DNA 層次中找出差異性，建立鑑識的分子標誌，應用於育種及品種改良(徐及曾, 1993)。

在物種鑑定的運用方面，Haymer *et al.* (1992) 利用 DNA 指紋技術來檢視鑑定地中海果實蠅 (Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*) 不同的 strains 中遺傳上的變化，在所檢測的五種不同 strains 中，利用 pmedM13e

和 pmedM13f 探針做雜合反應，可以得到鑑別力極高的 DNA 指紋圖譜，清楚的區分出五種不同的 strains，並且在相同的 strain 中具有相同而穩定的 DNA 指紋圖譜，顯示出此方法在不同 strains 間的鑑別性，而在相同的 strain 間具有的同質性，因此在物種鑑定上是一種可利用的分子標誌。

三、聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術結合限制酵素片段多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析  
此分析技術結合了兩種生物技術的方法，分別敘述如下：

(一) 聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術

聚合酵素連鎖反應技術是 Kary Mullis 醫生於 1983 年所構想出的技術，但直到 1985 年才將整套構想實際的應用，增幅出  $\beta$ -球蛋白基因 ( $\beta$ -globin gene)，藉以診斷鐮刀型血球貧血症。早先的科學家是使用 *E. coli* DNA polymerase 來進行聚合酵素連鎖反應，但因此酵素不耐熱，所以每經一次循環就要再加 DNA polymerase，相當不方便，直到從嗜高溫菌中成功的分離純化出具耐熱性的 *Taq* polymerase 之後，進行連續性的增幅作用，才使 PCR 技術真正推向實用的領域 (Saiki *et al.*, 1986; Saiki *et al.* 1988)。

PCR 技術主要包括三個步驟：(1) DNA 的變性 (denature)----將模板 DNA (template DNA)、引子 (primer)、四種去氧核糖核苷三磷酸鹽 (dNTP) 及適當的緩衝液混合，加熱至 90-95°C，使雙股 DNA 變性成單股 DNA。(2) DNA 的黏合 (anneal)----接著將溫度冷卻以促進引子的黏合反應。(3) DNA 的延伸 (extension)----引子黏合於適當位置後，再升溫至 DNA polymerase 最適合反應的溫度 (約 70°C)，藉由 DNA polymerase 的作用而延伸相對於模板 DNA 的另一股 DNA (林, 1995)。

變性、黏合及延伸三個步驟稱為一個循環。以此增幅原理，如果循環  $n$  次，那麼最終增幅的 DNA 產物將是原來的  $(1+k)^n$  倍，其中  $k$  為增幅效率。因此利用 PCR 技術可以使 DNA 片段大幅擴增，大大的擴展分子生物技術的使用範圍，只要少量的待測物，如幾個細胞、動植物標本的碎片、甚至是化石中的生物，只要其中有特定的 DNA 片段，便可以將 DNA 片段擴增，而提供其他分子生物技術做檢測分析與研究 (魯及歸, 1995)。

(二) 限制酵素片段多態型 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析

此技術是利用核酸限制內切酵素將純化的 DNA 做切割處理，如此可以得到不同 DNA 長度的片段，經過膠體電泳後顯現出多態型的 DNA 片段圖譜，此即所謂的限制酵素片段多態型。RFLP 分析技術可獨自進行 (Varga, 1993) 或配合其他技術做分析，選用適當的核酸限制內切酵素可以用來區別屬、種的分類層級，或種以下的分類階級，如 biotype。

目前在快速鑑定上的應用多配合聚合酵素連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 技術，增幅細胞核中或粒線體內 DNA 的核糖體形成基因 (ribosomal DNA, rDNA)，進而進行核酸限制內切酵素切割的 RFLP 分析 (Chen *et al.*, 1992; Gasparich *et al.*, 195; Fenton *et al.*, 1995; Orui and Mizukubo, 1999)。由於 rDNA 在同種昆蟲中穩定性高，而不同種昆蟲間的變異性高，且在昆蟲體內具有大量重複的相同複製單位 (copies)，並且已有通用的增幅引子 (universal primers)，可以很容易增幅出大量需要的 DNA，因此此段基因很適合拿來作為鑑定分析之用 (Hillis and Dixon, 1991)。有關 rDNA 及增幅 rDNA 片段所使用的引子，在 1990 年 White *et al.* 及 1995 年 Kambhampati and Smith 的研究報告中有詳盡的敘述，一般所使用的引子其核苷酸序列及所增幅的 rDNA 片段相關位置，參看圖五及表一。

Armstrong *et al.* (1997) 收集了 23 種果實蠅，分屬於 3 個不同的屬及來自 9 個不同的國家或地區，利用 PCR 的技術增幅 rDNA 的片段，發現在核糖體體的轉錄單位中，增幅其中的 18S subunit / internal transcribed spacer (ITS) 部份，可用來辨別果實蠅的種類。此增幅的 DNA 片段分別以 *RsaI*、*Sau3a*、*AluI* 及 *HaeIII* 四種核酸限制內切酵素對增幅的 DNA 片段做切割反應得到四類的 RFLP 圖譜。分析比較這 23 種果實蠅在不同核酸限制內切酵素切割所得的 RFLP 圖譜，發現可以用來鑑定出特定種類的果實蠅。比較分析各種方法，認為結合 rDNA/PCR/RFLP 的新技術，不僅可鑑定成蟲，更適用於鑑定不易區分的卵、幼蟲及蛹的生長時期，提供快速、準確且簡便的鑑定方法，可以開發運用於害蟲的檢疫鑑定工作上。

#### 四、PCR 指紋 (PCR fingerprinting) 分析

此項技術是一種使用簡單、重複的核苷酸序列當引子，利用 PCR 的增幅技術增幅適當的 DNA，再經由適當的膠體電泳而得到多態型的 DNA 片段圖譜，並以此作為鑑定分析，此方法快速且只需要 10-50 ng 的 DNA

即可進行 (Lieckfeldt *et al.*, 1993)。其中 DNA 隨機增幅多態型聚合酵素連鎖反應分析 (random amplified polymorphic DNAs polymerase chain reaction, RAPD-PCR) 和 DNA 增幅指紋技術 (DNA amplification fingerprinting, DAF) 均屬於此類技術，也是目前常使用的鑑定分析方法。

(一) DNA 隨機增幅多態型聚合酵素連鎖反應分析：

此方法是以隨機組合十個核苷酸分子 (G 加 C 所佔的比例約為 50%~80%) 而形成的單一引子，以 PCR 的技術隨機增幅反應中的 DNA，其所增幅的 DNA 分子大小與數目，可用來作為物種鑑定的依據 (Heinze, 1994；Williams *et al.*, 1990；魯及歸, 1995)。

De Barro and Driver (1997) 以 RAPD-PCR 鑑別 *Bemisia tabaci* B 型生物小種與非 B 型生物小種，在經過 60 個不同的引子測試後，其中有 F2、F12、H9 及 H16 四個引子可以鑑別這些不同的生物小種，並且可以清楚的分辨出 B 型與非 B 型生物小種。另外本技術亦可用於非成蟲期蟲體的鑑定，分別以卵、一到四齡的幼蟲及成蟲進行 RAPD-PCR 的鑑定分析，結果發現不論卵期、幼蟲期與成蟲期之蟲體所得到的結果均相同。顯示出以 RAPD-PCR 的方法來鑑定 *Bemisia tabaci* 的生物小種，具有快速、簡單的優點，且花費成本低、只需要極少量的檢體、任何齡期的蟲體均可進行鑑定，運用在具有時效性的檢疫鑑定工作上甚為適合。

目前很多研究均利用 RAPD-PCR 的技術來探討昆蟲的分類及親緣關係，例如從事煙草粉蝨 (*Bemisia tabaci*) Non-B 和 B-Biotype 的區分 (Gawel and Bartlett, 1993；Guirao *et al.*, 1997)；蝗蟲族群遺傳上的探究 (Chapco *et al.*, 1992)；蚜蟲種類的鑑定 (Black *et al.*, 1992；Cenis *et al.*, 1993)；亞洲和北美吉普賽舞蛾的區分 (Garner and Slavicek, 1996)；蚊種類的鑑定 (Ballinger-Crabtree *et al.*, 1992；Wilkerson *et al.*, 1995) 以及地中海果實蠅族群的研究 (Haymer and McInnis, 1994) 等，運用的層面愈來愈廣。

(二) DNA 增幅指紋技術：

此方法是利用具有任意的短鏈寡核苷酸作為引子 (short arbitrary oligonucleotide primers,  $\geq 5$  nt)，而這些引子的序列是依據某些基因而來。然後使用這類單一引子或數個引子進行 PCR 增幅作用，選擇性的增幅反應中的 DNA，利用所增幅的 DNA 分子大小與數目，可用來作為物種鑑定的依據 (Caetano-Anolles and Bassam, 1993)。

McIntosh *et al.* (1996) 以 DAF 技術分析包括鱗翅目、鞘翅目、雙翅

目及膜翅目在內的細胞株 DAF 圖譜，得到不錯的鑑別效果，以 primer set 1 (為二個引子的反應組合) 增幅 14 種鱗翅目昆蟲的細胞株為例，其 DAF 圖譜分析得知，由不同種昆蟲來源的細胞株具有不同的條帶，而自同種昆蟲來的細胞株具有類似的條帶 (圖六)。而且這些指紋圖譜在細胞株不同次數的繼代培養情況下，也具有穩定的圖譜特徵。除此之外，細胞株與細胞株的來源的昆蟲，也具有相似的指紋圖譜。由此可知，DAF 技術在物種鑑定上是很穩定的分子標誌，且具有快速、準確及簡便上的優點，也極適合運用在海關的害蟲檢疫快速鑑定工作上。

### 參、結論

利用分子標誌為基礎從事分類鑑定的工作，對那些外表形態相當近似或是後胚胎發育有差異的種類 (如蝗蟲的長、短翅型，蜜蜂、螞蟻及白蟻的階級發育，蚜蟲的世代交替型，以及部份昆蟲的雌雄雙型等)，具有很高的可信度。如果僅利用外部形態進行分類，常常因為可利用的分類形質少或定義含糊，而造成分類上的困難度，或者可能產生同種異名的困擾。利用分子標誌進行分析，則同種生物不管外型如何改變，其體內的遺傳物質總是不變，或者是不同種生物不管外型如何近似，其體內的遺傳物質總是會有差異，可信度極高且操作簡便。

此外，利用上述的生物技術分析分子標誌，均可在一天之內完成鑑定工作，且分析的特徵相當明顯，直接從電泳膠片中即可得到答案，因此只要接受簡單訓練的人員便可進行鑑定分析工作，不需要專業的分類學家參與，所以利用生物技術分析分子標誌的方法是一項快速、準確且簡便的分類鑑定技術，將來作為海關害蟲檢疫的快速鑑定極為適合，具有研發應用的潛力，值得深入研究。

### 肆、參考文獻

- 林萬明。1995。PCR 技術操作和應用指南。人民軍醫出版社。525 頁。
- 徐泰浩、曾耀銘 (編譯)。1993。生物技術概論。藝軒圖書出版社。266 頁。
- 魯亮、歸鴻。1995。RAPD 技術的特點及其在昆蟲分類中的應用。昆蟲學報 38(1): 117-121。
- Armstrong, K. F., C. M. Cameron, and E. R. Frampton. 1997. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) species identification: a rapid molecular diagnostic technique for quarantine application. Bull. Entomol. Res. 87: 111-118.

- Ballinger-Crabtree, M. E., W. C. Black, and B. R. Miller. 1992. Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and population. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47: 893-901.
- Bassi, V., and M. Veuille. 1995 Comparative population structuring of molecular and allozyme variation of *Drosophila melanogaster* Adh between Europe, west Africa and east Africa. *Genet Res.* 65: 95-103.
- Black, W. C., N. M. DuTeau, G. J. Puterka, J. R. Nechols, and J. M. Pettorini. 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bull. Entomol. Res.* 82: 151-159.
- Caetano-Anolles, G., and B. J. Bassam. 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Apple. Biochem. Biotech.* 42: 189-200.
- Cenis, J. L., P. Perez, and A. Farers. 1993. Identification of aphid (Homopterus: Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 86: 545-550.
- Chapco, W., N. W. Ashton, R. K. B. Martel, and N. Antonishyn. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematic of grasshoppers. *Genome* 35: 569-574.
- Chen, W., J. W. Hoy, and R. W. Schneider. 1992. Species-specific polymorphisms in transcribed ribosomal DNA of five *pythium* species. *Exp. Mycol.* 16: 22-34.
- Dadour, I. R., D. K. Yeates, and A. Postle. 1992. Two rapid diagnostic techniques for distinguishing Mediterranean fruit fly from *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 208-211.
- De Barro, P. J., and F. Driver. 1997. Use of RAPD PCR to distinguish the B biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Aust. J. Entomol.* 36: 149-152.
- Fenton, B., G. Malloch, A. T. Jones, J. W. Amrine Jr, S. C. Gordon, S. A'Hara, W. J. McGavin and A. N. E. Birch. 1995. Species identification of

- Cecidophyopsis* mites (Acari: Eriophyidae) from different *Ribes* species and countries using molecular genetics. *Mol. Ecol.* 4: 383-387.
- Garner, K. J., and J. M. Slavicek. 1996. Identification and characterization of a RAPD-PCR marker for distinguishing Asian and North American gypsy moths. *Insect Mol. Biol.* 5: 81-91.
- Gasparich, G.E., W. S. Sheppard, H. -Y. Han, B. A. McPheron and G. J. Steck. 1995. Analysis of mitochondrial DNA and development of PCR-based diagnostic molecular markers for Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) populations. *Insect Mol. Biol.* 4: 61-67.
- Gawel, N. J., and A. C. Bartlett. 1993. Characterization of differences between white flies using RAPD-PCR. *Insect Mol. Biol.* 2: 33-38.
- Guirao, P., F. Beitia, and J. L. Cenis. 1997. Biotype determination of Spanish populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Bull. Entomol. Res.* 87: 587-593.
- Gunning, R. V., F. J. Byrne, and A. L. Devonshire. 1997. Electrophoretic analysis of non-B and B-biotype *Bemisia tabaci* in Australia. *Aus. J. Entomol.* 36: 245-249.
- Haymer, D. S., and D. O. McInnis. 1994. Resolution of populations of the Mediterranean fruit fly at the DNA level using random primers for the polymerase chain reaction. *Genome* 37: 244-248.
- Haymer, D. S., D. O. McInnis, and L. Arcangeli. 1992. Genetic variation between strains of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, detected by DNA fingerprinting. *Genome* 35: 528-533.
- Heinze, B. 1994. RAPD reactions from crude plant DNA. *Mol. Biotech.* 1: 307-310.
- Hillis, D.M., C. Moritz, and B. K. Mable. 1996. *Molecular systematics* (Second Edition). Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts U.S.A. 655pp.
- Hillis, D.M., and M. T. Dixon. 1991. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Inoue, H., and J. Mitsuhashi. 1988. A new *Bombyx mori* continuous cell line from embryos and its characterization. pp. 199-206 in J. Mitsuhashi, ed. *Invertebrate Cell System Applications*. Vol. II. CRC Press, Boca Raton,

Florida.

- Kambhampati, S., and P. T. Smith. 1995. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Mol. Biol.* 4: 233-236.
- Lieckfeldt, E., W. Meyer, and T. Borner. 1993. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.* 33: 413-426.
- Liu, H. Y., S. Cohen, and J. E. Duffus. 1992. The use of isozyme patterns to distinguish sweet potato whitefly (*Bemisia tabaci*) biotypes. *Phytoparasitica* 20: 187-194.
- McIntosh, A. H., J. J. Grasela, and R. L. Matteri. 1996. Identification of insect cell lines by DNA amplification fingerprinting (DAF). *Insect Mol. Biol.* 5: 187-195.
- Mullis, K. B., R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Orui, Y., and T. Mizukubo. 1999. Discrimination of seven *Pratylenchus* species (Nematoda: Pratylenchidae) in Japan by PCR-RFLP analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 34(2): 205-211.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Saiki, R. K., T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1986. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ DNA probes with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324: 163-166.
- Varga, J. 1993. Restriction fragment length polymorphisms in the mitochondrial DNAs of the *Aspergillus niger* Aggregate. *Mycol. Res.* 97: 1207-1212.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322 in M. A. Innis, D. H. Gelgand, J. J. Sninsky, and T. J. White., eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic

Press Inc., San Diego.

- Wilkerson, R. C., T. J. Parsons, T. A. Klein, T. V. Gaffigan, E. Bergo, and J. Consolim. 1995. Diagnosis by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction of four cryptic species related to *Anopheles (Nyssorhynchus) albitarsis* (Diptera: Culicidae) from Paraguay, Argentina and Brazil. *J. Med. Entomol.* 32: 697-704.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, J. A. Rafalski, and S. V. Tingey. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- Zenhder, G. W., J. T. Trumble, and W. R. White. 1983. Discrimination of *Liriomyza* species (Diptera: Agromyzidae) using electrophoresis and scanning microscopy. *Proc. Entomol. Soc. Wash.* 85: 564-574.